

Bazı Makarnalık Buğday (*T. durum* Desf.) Çeşitlerinin *In Vitro* Koşullarda Yüksek Tuz Dozlarına Tepkileri

Nur KOYUNCU

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara
Sorumlu yazar e-posta: nurkoyuncu@gmail.com

Geliş tarihi (Received): 10.10.2012

Kabul tarihi (Accepted): 03.12.2012

Öz

Türkiye’de yetiştirilen 13 makarnalık buğday (*T. durum* Desf.) çeşidinin olgunlaşmış embriyoları kullanılarak *in vitro* koşullarda tuza toleransları değerlendirilmiştir. Değişik NaCl konsantrasyonları (0,3,6,9,12,15,18 g/l) embriyolara kallus oluşumu aşamasından itibaren uygulanmıştır. Çeşitler kallus oluşumu, kallus ağırlığı ve rejenerasyon sayısı parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Artan tuz dozları ile bütün parametrelere ilişkin değerler azalmış ve çeşitler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Buna göre Mirzabey-2000 ve Selçuklu-97 çeşitlerinin yüksek tuz dozlarında, diğer çeşitlere göre daha iyi geliştiği ve bu çeşitlerin ıslah çalışmalarında genitör olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: NaCl, kallus oluşumu, *in vitro*, makarnalık buğday

Response of Some Durum Wheat (*T. durum* Desf.) Cultivars to *In Vitro* High Level Salinity

Abstract

Salt tolerance of 13 durum wheat (*T. durum* Desf.) genotypes, which are grown in Turkey, were assessed on *in vitro* conditions using mature embryos. They were exposed to different concentration of NaCl (0,3,6,9,12,15,18 g/l) from initiation of the callus induction. Cultivars evaluated based on callus induction, weight of callus and number of regenerated callus parameters. All parameters decreased with increasing salt levels and there were significant differences among genotypes. Accordingly it was found that Mirzabey-2000 and Selçuklu-97 cultivars grew better than the other cultivars at high salt levels and they may be used as genitors in breeding programs.

Key Words: NaCl, callus induction, *in vitro*, durum wheat.

Giriş

Ülkemiz topraklarında drenaj bozukluğu ile birlikte görülen tuzluluk ve alkalilik yanında, sulama ve toprak yapısından kaynaklanan tuzluluk en çok Orta Anadolu Bölgesinde ve alüvyal kıyı ovalarımızda 1,5-6,5 g/l değerleri arasında görülmektedir (Munsuz ve ark. 2001). Küresel ısınmanın etken olduğu düzensiz/aşırı yağışlar, artan yüzey buharlaşması ile yanlış tarım uygulamaları nedeniyle artan toprak tuzluluğunun gelecek 25 yıl içerisinde ekim alanlarını %30 düzeyinde azaltacağı tahmin edilmektedir (Rai et al. 2011).

Tuzluluk, her yıl önemli miktarda ürün kayıplarına neden olmaktadır. Biyotik ve abiyotik (sıcak, soğuk, kuraklık ve tuzluluk) stres etmenlerinin yıllık yaklaşık % 25 ürün kaybı oluşturduğu bildirilmektedir (Gill et al.

2004). Tuzlulaşan alanlarda bitkisel üretimin devamı için genotiplerin tuza dayanıklılığının belirlenmesi ve artırılması gerekmektedir. Tuzluluğa toleransı orta düzeyde olan buğdayın genotipleri arasında tuza tolerans bakımından önemli farklılıklar görülmektedir (Ashraf 1994, Zair et al. 2003, Dokuyucu ve ark 2005). Günümüzde klasik ıslah yöntemleri *in vitro* tekniklerle desteklenerek tuza toleranslı hücreler kültür ortamında seçilebilmekte ve bunlardan bitki elde edilebilmektedir. (Tal 1993, Winicow 1996). Yapılan son çalışmalar buğdayın tuzluluğa toleransının artırılmasında doku kültürü ile seleksiyonun etkili olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Karadimova and Djambova 1993, Arzani and Mirodjagh 1999, Barakat and Abdel-Latif 1996, Zair et al. 2003).

Değişik fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerle değerlendirilen çimlendirme

testi ile bitkilerin çimlenme ve fide dönemlerindeki tuz toleransı belirlenmektedir. (Soltani et al. 2004, Abdel-Aleem et al. 1994, Pancholi et al. 2001, Sultana et al. 2000, Sadat Noori and Mcneilly 2000, Almansouri et al. 1999, Prakash and Sastry 1992). Ancak bitkinin ilk dönemde gösterdiği dayanıklılığı gelişme dönemleri ilerledikçe sürdürmediği bilinmektedir (Ashraf and Akram 2009). Kalluslarda seleksiyon yapılan *in vitro* çalışmalarda ise, kallusların totipotensi özelliği sayesinde bitkinin bir gelişme dönemine bağlı kalınmadan genel bir değerlendirme yapılması mümkün olmaktadır (Barakat 1996).

Bu çalışma ile Türkiye'de yetiştirilen bazı makarnalık buğday çeşitlerinin *in vitro* koşullarda yüksek tuzluluğa tolerans düzeyi incelenmiştir. Bu çeşitlerden doğrudan kullanımlarının yanında, klasik ıslah ya da biyoteknolojik gen aktarımı çalışmalarında tuzluluk genitörü olarak yararlanılabilme olanakları değerlendirilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada, toprakta en çok bulunduğu ve bitkilere önemli düzeyde zarar verdiği bilinen NaCl tuz formu, 0 (tuzsuz), 3 (az tuzlu), 6 (orta tuzlu), 9, 12, 15 ve 18 g/l (yüksek tuzlu) dozlarında kullanılarak, toprakların tuzluluk düzeyine yakın değerler alınmıştır (Munns and Termaat 1986). Embriyo kültürü ile kallus oluşturmada eksplant olarak, her zaman kolaylıkla ve bol miktarda elde edilebilen olgunlaşmış embriyolardan yararlanılmıştır. *In vitro* koşullarda, yüksek oranda kallus oluşumu ve kallus ağırlığı sağladığı bilinen endosperm destekli yöntemle, embriyonun kendi doğal besin kaynağı olan endosperm kullanması sağlanmış, böylelikle araştırmanın ilk aşamasında yapay besin ortamına gerek kalmamıştır (Özgen ve ark 1998). Çalışmanın başladığı dönemde, üretimleri yapılmakta olan çeşitleri içeren TİGEM'in çeşit kataloğu sağlanmış ve buradaki makarnalık tescilli çeşitler Altın 40/98, Ankara-98, Aydın-93, Çeşit-1252, Diyarbakır-81, Fırat-93, Harran-95, Kızıltan-91, Kunduru-1149, Sarıçanak-98, Selçuklu-97, Mirzabey-2000, Yelken-2000 bitki materyali olarak kullanılmıştır.

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için etil alkolde (% 70) 5 dakika bekletilip 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra, 25 dakika ticari çamaşır suyunda (% 5 sodyum hipoklorit) çalkalanıp 7 kez steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra tohumların 2 saat süre ile steril suda (33 °C) bekletilerek şişmeleri sağlanmıştır. Kallus oluşturmak için steril pens

ve bistüri yardımı ile endospermden ayrılmadan gevşetilen embriyolar 7 ml sıvı ortamda (2,4-D (8 mg/l) ve NaCl (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 g/l) içeren) kültüre alınmıştır. Petriler 25±1 °C ve karanlık koşullarda 11 gün bekletilerek kallus oluşumu ve kallus ağırlığı değerleri belirlenmiştir (Özgen ve ark 1998).

Oluşan kalluslar gelişim aşaması için 21 gün süre ile MS (Murashige and Skoog 1962) besin ortamı, sukroz(20 g/l), aynı değerde NaCl ve agar (6 mg/l) içeren ortamda 25 ±1 °C sıcaklık ve karanlıkta 3 hafta bekletilmiştir. Rejenerasyon aşaması aynı ortamla alt kültür edilen petriler iklim odasında 25 ±1 °C sıcaklık ve 16 saat ışık-8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında 21 gün tutularak sağlanmıştır. Bu süre sonunda yeşil noktacık oluşturan kalluslar sayılarak petri (tekrar) başına rejenerasyon kallus sayısı belirlenmiştir.

Kallus oluşumu ve rejenerasyon için hazırlanan ortamlar pH'sı 5,8'e ayarlanarak, 20 dakika 121 °C ve 1,1 kg/cm² basınçta otoklavlanarak steril edilmiştir. Çalışma 20 embriyo içeren petrilerde üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen sonuçlar varyans analizi ve asgari önemli fark testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Tuz dozları ve parametreler arasındaki korelasyon katsayıları belirlenmiştir. Yüzde değerlere istatistiksel analiz öncesinde arcsin (\sqrt{X}) transformasyonu uygulanmıştır (Snedecor and Cochran 1967).

Bulgular ve Tartışma

Her tuz dozu için 60 tohumun kullanıldığı çalışmada çeşitlerin kallus oluşumu ve kallus ağırlığı değerleri karşılaştırılmıştır. Artan dozlarda NaCl içeren sıvı ortamlarda kallus oluşumu 2-3 gün sonra başlamıştır. Kalluslar 11 gün sonra maximum büyüklüğüne ulaşmıştır (Özgen ve ark 1998). Çeşitlerin kallus oluşturma oranları artan tuz dozları ile azalmış, 15 g/l tuz düzeyinde çeşitlere göre % 43.3 ile 0'a kadar düşmüştür. Ortamda 15 g/l tuz bulunduğu Ankara-98 ve Kızıltan-91 çeşitlerinde kallus oluşumu gerçekleşmemiştir (Çizelge 1). Bununla birlikte bu dozda en yüksek kallus oluşumu Mirzabey-2000 (% 43.3), Selçuklu-97 (% 21.7) çeşitlerinde görülmüştür. Çeşitlerde kallus oluşumu oranları 9 g/l düzeyinden itibaren tuzsuz ortama göre yüzde elliden fazla azalmaya başlamıştır (Çizelge 2). Tuz içermeyen ortamda % 97.4 olan kallus oluşturma ortalaması 18 g/l dozunda % 4.4'e kadar düşmüştür.

Azalan kallus oluşumu ile birlikte kallus ağırlığı da doğrusal olarak düşmüştür. Düşük dozlarda daha yüksek ağırlığa sahip kallusların, dozlar arttıkça daha küçük çaplı ve hafif formda olmaları dikkati çekmiştir. Bu durum tuz dozları arasında görülebildiği gibi aynı dozda tuz uygulanan farklı çeşitlerin kalluslarında da görülmüştür. Kallus oluşturma yeteneğinin genotiple doğrudan ilişkili olduğu doku kültürü çalışmalarının başlangıcından itibaren doğrulanmıştır (Sears and Deckard 1982, Lazar et al. 1983, Özgen ve ark 1998). Bulgularımıza benzer olarak, Arzani and Mirodjagh (1999) tarafından 28 makarnalık buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını

kullanarak *in vitro* ortamda yapılan çalışmada, kallus oluşumu ve kallus ağırlığı parametreleri dikkate alınmıştır. Tuz dozlarının artması ile kallus gelişiminde azalmalar olduğu, % 1-1.5 NaCl dozlarından sonra kallusların rejenerasyon yeteneğini yitirdiği saptanmıştır. Yine benzer araştırma yapan Zair et al. (2003) da, 7 makarnalık ve 1 ekmeçlik buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarında, genel olarak tuz miktarı arttıkça (2.5 g/l'den sonra) kallus oluşumunun azaldığını, bununla birlikte bazı çeşitlerde 10-15 g/l dozlarında bile yüksek oranda kallus oluştuğunu gözlemişlerdir.

Çizelge 1. Makarnalık buğday çeşitlerinin 15 g/l NaCl dozunda kallus oluşumu, kallus ağırlığı, rejenera kallus sayısı ortalamaları

Genotip	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (mg)	Rejenera Kallus Sayısı
Altın-40/98	13.3bcd	50.7cd	2ab
Ankara-98	0d	0d	0b
Aydın-93	8.3bcd	66.7cd	0.7b
Çeşit-1252	11.7bcd	95.3cd	0.7b
Diyarbakır-81	3.3cd	66.7cd	0b
Fırat-93	3.3cd	44cd	0b
Harran-95	5cd	114bcd	0.3b
Kızıltan-91	0d	0d	0b
Kunduru-1149	3.3cd	53.7cd	0.7b
Mirzabey-2000	43.3a	467a	4.3a
Sarıçanak-98	13.3bcd	133bc	2.3ab
Selçuklu-97	21.7b	209b	2.3ab
Yelken-2000	16.7bc	123bc	2.3ab
Ortalamalar	11.0±2.1	110±20.6	1.2±0.3

*Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında 0.05 düzeyinde önemli farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 2. Tuz dozlarının *in vitro* parametre ortalamalarına etkileri

Ortalamalar	Dozlar (g/l)						
	0	3	6	9	12	15	18
Kallus Oluşumu (%)	97.4±0.6	91.4±1.3	70.3±2.9	55.3±3.1	36.8±3.4	11.0±2.1	4.4±1.2
Kallus Ağırlığı (mg)	1599±45.8	1469±37.2	1005±45.7	667±43.7	416±42.8	110±20.6	46±10.8
Rejenera Kallus Sayısı	19.4±0.1	18.3±0.3	13.9±0.6	8.9±0.6	3.9±0.5	1.2±0.3	0.2±0.6

Çizelge 3. Tuz dozları ile *in vitro* parametreler arasındaki ilişkiler

	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (mg)	Rejenera Kallus Sayısı
Dozlar	-0.916**	-0.916**	-0.932**

** : 0.01 düzeyinde önemli

Öte yandan, Karadimova and Djambova (1993), 1 ekmeçlik ve 3 makarnalık buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını eksplant olarak kullandıkları *in vitro* tuzluluk çalışmasında, genotiplerin tuza toleranslarını, kallusların gelişme oranını ve kallus ağırlığını karşılaştırarak belirlemişlerdir. Kallus ağırlığını tuza tolerans göstergesi olarak kullanan diğer araştırmacılar Barakat and Abdel-Latif (1996) 4 ekmeçlik buğday çeşidinin, Sudyova et al. (2002) 3 ekmeçlik buğday ve 2 tritikale çeşidinin, olgunlaşmamış embriyolarından geliştirdikleri kalluslarda, ortamın tuz dozu arttıkça kallus ağırlığının azaldığını belirlemişlerdir.

Benzer şekilde Kintzios et al. (1997) yüksek dozların kallus büyümesini yavaşlattığını, kök oluşumu ve sürgün gelişimini azalttığını bildirmişlerdir. Nitekim tuz dozu ile kallus oluşumu ($r=-0,916^{**}$) ve ağırlığı ($r=-0,916^{**}$) arasındaki korelasyon önemli bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 3). Tohumun bulunduğu ortamdan aldığı tuz, bazı hücre kısımlarının zarar görmesine neden olmakta, hücre bölünmesi ve gelişimi üzerinde direkt önleyici etkiye bulunabilmektedir (Zhu 2001). Embriyolardan oluşan kallusların hacimleri ve ağırlıkları üzerinde bu durumun etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Düşük dozlarda beyaz, kompakt ve rejenerasyon olabilen kallusların 9 g/l dozundan itibaren kahverengileşmeye başladığı, 15 g/l dozunda Ankara-98, Diyarbakır-81, Fırat-93 ve Kızıltan-91 çeşitlerinin rejenerasyon yeteneğini kaybettiği, Aydın-93, Çeşit-1252, Harran-95, ve Kunduru-1149 çeşitlerinin ise sifıra yakın değerler gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 1). Yelken 2000 çeşidinde rejenerasyon kallus sayısı Selçuklu-97 çeşidi ile aynı miktarda olsa da kallus oluşturma yüzdesinin daha düşük (% 16.7) olduğu görülmektedir. Kallus oluşumunun 18 g/l tuz dozunda Ankara-98, Fırat-93, Harran-95, Kızıltan-91, Yelken-2000 çeşitlerinde gerçekleşmediği, Mirzabey-2000 (% 11.7) ve Selçuklu-97 (%10) çeşitlerinde ise kullanılan çeşitler arasında en yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge verilmemiştir).

Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışma ile makarnalık buğday çeşitlerinin düşük tuz dozlarından itibaren *in vitro*da gösterdiği gelişim incelenerek, yüksek dozlarda kallus oluşturma ve rejenerasyon yeteneğindeki azalma değerlendirilmiştir. Sonuçları verilen 15 g/l tuz dozu makarnalık buğday ekim alanlarımızda şu anda bulunmayan, ülkemiz toprakları için

yüksek bir tuz düzeyidir. Kullanılan makarnalık buğday çeşitleri ile genotip etkisinin önemli bulunduğu çalışmada; Mirzabey-2000 ve Selçuklu-97 çeşitlerinin 15 ve 18 g/l dozlarında diğer çeşitlere göre daha yüksek düzeyde kallus oluşumu ve gelişimi gösterdikleri için, tuza dayanıklılığın artırılması çalışmalarında genitör olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda tuzluluk sorunu karşısında Mirzabey-2000 çeşidinin Orta Anadolu Geçit Bölgelerinde, Selçuklu-97 çeşidinin ise Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinin sulanan alanları ile taban arazilerinde doğrudan kullanılması önerilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Ankara Üniversitesi tarafından (Proje No: BAP 2005 K 120140) desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abdel-Aleem M.M.M., S.R.S. Sabry, N.S. Hanna, 1994. Seedling characteristics as selection criteria for salinity tolerance in wheat. *Rachis*, 11(1-2): 33-40.
- Almansouri M., J.M. Kinet. and, S. Lutts, 1999. Compared effects of sudden and progressive impositions of salt stress in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. *J. Plant Physiol*, 154: 743-752.
- Arzani A. and S-S. Mirodjagh. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress. *Plant Cell Tiss Org*, 58: 67-72.
- Ashraf M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(1): 17-42.
- Ashraf M and N.A. Akram. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnol Adv*, 27: 744-752.
- Barakat M.N. and T.H. Abdel-Latif. 1996. *In vitro* selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. *Euphytica*, 91: 127-140.
- Dokuyucu T., S. Akkececi, A. Akkaya and R. Kara. 2005. Investigation of the response of bread wheat cultivars to salinity by using callus cultures. *J Environ Biol*, 26(2): 251-255.
- Gill B.S., R. Appels, A-M. Botha-Oberholster, C.R. Buell, J.L. Bennetzen, B. Chalhoub, F. Chumley, J. Dvorak, M. Iwanaga, B. Keller, W. Li, W.R. McCombie, Y. Ogihara, F. Quetier, and T. Sasaki, 2004. A workshop report on wheat genome sequencing: International genome research on wheat consortium. *Genetics*, 168: 1087-1096.

- Karadimova M. and G. Djambova. 1993. Increased NaCl-Tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf.) through *in vitro* selection. *In vitro* Cell Dev Biol, 29P: 180-182.
- Kintzios S.E., M. Barberaki, G. Aivalakis, J. Drossopoulus, and C.D. Holevas, 1997. *In vitro* morphogenetic responses of mature wheat embryos to different NaCl concentrations and growth regulator treatments. *Plant Breeding*, 116: 113-118.
- Lazar M., G.B. Collins and W.E. Vian. 1983. Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat and somatic cell cultures. *J of Heredity*, 74:353-357.
- Munns R and A. Termaat. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 143-160.
- Munsuz N., G. Çaycı, S. Sözüdoğru Ok, 2001. Toprak ıslahı ve düzenleyiciler. Ankara Üniversitesi Yayını: 1518, 335 s, Ankara.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Özgen M., M. Türet, S. Altınok, C. Sancak, 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Rep.* 18: 331-335.
- Rai M., R.K. Kalia, R. Singh, M.P. Gangola, A.K. Dhawan, 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection-An overview of the recent progress. *Environ Exp Bot*, 21: 89-98.
- Pancholi S.R., S.C. Bhargava, A.K. Singh, 2001. Screening of wheat genotypes at different salinity levels for germination percentage. *Ann Agri Bio Res*, 6(1): 53-55.
- Prakash V. and E.V.D. Sastry. 1992. Effects of salinity on germination and seedling growth in wheat. *Ann Arid Zone*, 31(1): 71-72.
- Sears R.G. and E.L. Deckard. 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. *Crop Sci*, 22:546-550.
- Sadat Noori S.A. and T. McNeilly. 2000. Assessment of variability in salt tolerance based on seedling growth in *Triticum durum* Desf. *Genet Resour Crop Ev*, 47: 285-291.
- Snedecor G.W. and W.G. Cochran. 1967. 'Statistical Methods.', The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Soltani A., M.H. Ghorbani, S. Galeshi and E. Zeinali, (2004). Salinity effects on germinability and vigor of harvested seeds in wheat. *Seed Sci Technol*, 32: 583-592.
- Sudyova V., S. Slikova, Z. Galova, 2002. Testing wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*Triticosecale* Witt.) callus to salt tolerance. *Acta Fytotechn Zootechn*, 3: 67-71.
- Sultana N., T. Ikeda, M.A. Kashem, 2000. Amelioration of NaCl stress by gibberellic acid in wheat seedling. *Bulletin of Faculty of Agriculture, Niigata University*, 52(2): 71-76.
- Tal M. 1993. *In vitro* methodology for increasing salt tolerance in crop plants. *Acta Horti*, 336: 69-78.
- Winicov I. 1996. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. *Plant Sci*, 113: 105-111.
- Zair I., A. Chlyah, K. Sabounji, M. Tittahsen, and H. Chlyah, 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. *Plant Cell Tiss Org*, 73: 237-244.
- Zhu J-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 6(2): 66-71.